

Automatische Aminosäure-Analyse physiologischer Flüssigkeiten¹⁾

Herrn Prof. Dr. H. W. BANSI zum 65. Geburtstag gewidmet

Von G. MÜLLER und P. JÜRGENS

Aus der 1. Medizinischen Abteilung (Chefarzt: Prof. Dr. H. W. Bansi) und dem Chemisch-physiologischen Institut (Leiter: Dr. Fr. Fretwurst) des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg

(Der Schriftleitung zugegangen am 13. Dezember 1964)

Es wird ein Verfahren zur automatischen Aminosäuren-Analyse an Ionenaustauschersäulen beschrieben, das von einem kommerziellen Gerät ausgeht und mit drei Puffern alle Aminosäuren von einer Säule eluiert. Sein Vorteil besteht darin, daß eine Reihe von Ninhydrin-positiven Substanzen analysiert werden können, die nach den Standardverfahren zur Aminosäuren-Analyse nicht oder nur schlecht getrennt werden und in physiologischen Flüssigkeiten stets vorkommen. Von 48 getesteten Ninhydrin-positiven Substanzen ließen sich 39 trennen.

A method, employing a commercial apparatus, is described for the automatic analysis of amino acids on ion exchange columns; all amino acids are eluted from one column with three buffers. Its advantage lies in the ability to separate a series of ninhydrin-positive substances, which occur in physiological fluids and separate badly or not at all in the standard methods of amino acid analysis. 48 ninhydrin-positive substances were tested, of which 39 were separated.

Seit der Beschreibung automatisch arbeitender Geräte zur Aminosäure-Analyse an Ionenaustauschersäulen (1, 2, 3) ist eine erhebliche Zahl von Arbeiten veröffentlicht worden, in denen verbesserte Analysenverfahren dargestellt werden (4). Dabei wurden vor allem drei Ziele angestrebt:

1. Steigerung des Trennvermögens, welches ursprünglich nur für die in einem Proteinhydrolysat vorliegenden Aminosäuren („AS“) ausreichend war;
2. Verringerung der benötigten optimalen Substanzmenge, die beim ursprünglichen 2-Säulenverfahren $2 \times 1 \mu\text{Mol}$ pro Komponente beträgt. In neuen Geräten gelangt man durch Steigerung der Meßempfindlichkeit (5) oder Verringern des Säulendurchmessers (6) in den Bereich von 2–10 nanoMol;
3. geringerer Zeitaufwand pro Analyse, der mit 24 Stunden, bei verbesserter Trennung der basischen AS sogar 48 Stunden (1, 7) für eine AS-Analyse recht erheblich ist. Apparative Verbesserungen, die das Arbeiten mit hohen Drucken ermöglichen, senken die Analysendauer auf 5–6 Stunden (8, 9).

Da es im Regelfall unmöglich ist, stets mit dem neuesten Gerät zu arbeiten, muß der Besitzer eines älteren Gerätes versuchen, dieses soweit wie möglich dem Stand der Technik anzupassen. Die bei uns vorhandene AS-Apparatur nach HANNIG (2), die zur Analyse von Proteinhydrolysaten entworfen wurde, sollte auch zur Untersuchung von physiologischen Flüssigkeiten (Serum, Urin) verwendet werden. Dazu mußte vor allem die Trennleistung gesteigert werden. Bei den Serumanalysen war eine Verringerung der Einsatzmenge wünschenswert. Außerdem sollte eine komplette Analyse in 24 Stunden abgeschlossen sein, wobei alle Manipulationen am Gerät im Laufe eines 8-Stunden-Arbeitstages erfolgen sollten.

Versuche

Die von HANNIG entwickelte Apparatur zur Trennung von AS mit automatischer Registrierung ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden (2). Seit 1963 wird das Gerät mit einer automatischen Pufferwechselvorrichtung geliefert, die an unserem Gerät vom Hersteller²⁾ nachträglich eingebaut wurde und die Voraussetzung für das nachstehend beschriebene Analysenprogramm ist.

Da der erste Puffer dieses Programms etwa 10 Stdn. fließen muß, somit die Kapazität einer Pumpe (etwa 9,5 Stdn.) und auch der Zeitraum eines normalen Arbeitstages überschritten wird, mußte ein Hilfsmittel herangezogen werden. Eine Schlauchspirale mit einem Volumen von 105 ml wurde aus 40 m Polyäthylenschlauch von etwa 2 mm Innen- und etwa 3 mm Außendurchmesser gewickelt und nach Abbildung 1 zwischen die Pumpen, das Magnetventil und einen zusätzlichen Dreiwegehahn eingefügt. Man erreicht damit, daß noch $3\frac{1}{2}$ Stdn. nach dem Umschalten von Pumpe 1 auf Pumpe 2 der Puffer pH = 3,00 gefördert wird, da eine Vermischung in dem Polyäthylenschlauch praktisch

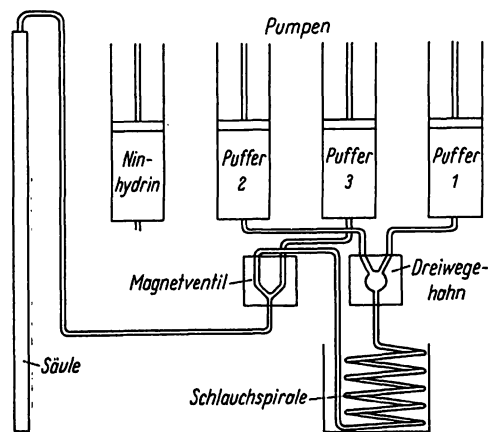


Abb. 1

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Fa. Bender und Hobein, München.

nicht eintritt. Entsprechend Abbildung 1 werden die Pumpen (in anderer Reihenfolge als nach der Originalvorschrift) numeriert und mit den drei Puffern gefüllt. Zur Trennung wurden Säulen $115 \times 0,9$ cm aus *Amberlite CG 120 III 3545* verwendet. Das zuvor erprobte weniger scharf gesiebte Harz *Amberlite CG 120 III/AS* ist ebenfalls für diese Trennung geeignet; die Auflösung ist geringfügig schlechter.

Die Puffer wurden nach folgender *Tabelle* hergestellt. Auf ein Aufkochen der Puffer wurde verzichtet. Die angegebenen Mengen wurden mit H_2O auf 10 l aufgefüllt:

Puffer Nr.	pH	[Na] n	Na-Citrat g	HCl konz. ml	Brij 35 g	Thiodi-glycol ml	Caprylsäure ml
1	3,00 ($\pm 0,02$)	0,2	196	136	9	50	1
2	4,10 ($\pm 0,02$)	0,2	196	92	9	50	1
3	4,00 ($\pm 0,02$)	1,5	1470	595	9	—	1

Na-Citrat $\cdot 2H_2O$ p. a., Merck
HCl konz. p. a., Merck
Brij 35, Serva

Thiodiglycol, Schuchardt
Caprylsäure, Riedel de Haen

Die Anfangstemperatur der Säulen ist $31,5^\circ$. Um von der Endtemperatur (65°) schnell herunterkühlen zu können, muß der Thermostat einen Wasseranschluß haben. Die Schlauchspirale wird mit etwa 150 ml (in einem Meßzylinder auffangen!) Puffer pH = 3,00 gespült und gefüllt. Zweckmäßigerweise wird zugleich mit dem Beginn der Elution die Registrierung eingeschaltet. Nach etwa 5 Stunden wird die Ninhydrinpumpe neu aufgefüllt, da ihr Volumen nur für etwa 19 Stunden reicht. Bei Erscheinen des Threonin-Peak (etwa $6\frac{1}{2}$ Stdn.) wird von Pumpe 1 auf Pumpe 2 umgestellt und auf der automatischen Schaltuhr 1 (Pufferwechsel 2 auf 3) $8\frac{1}{2}$ Stunden, auf der Schaltuhr 2 (Endabschaltung) 9 Stunden eingestellt. $\frac{1}{2}$ Stunde nach Erscheinen des Threonin-Peak (etwa 7 Stdn.) wird die Säulentemperatur auf 65° gesteigert. Damit kann das Gerät der automatischen Steuerung überlassen werden. Normalerweise läuft das Gerät morgens bei Arbeitsbeginn noch und die Registrierung von Tryptophan ist möglich; während auf der Nachbarsäule die neue Probe eingefüllt wird. — Durch die hohe Natrium-Konzentration des 3. Puffers schrumpfen die Säulen ein wenig. Wegen der hierdurch entstehenden Drucksteigerung sollten sie nach einigen Monaten neu gefüllt werden.

Als Beispiel für die erreichte Trennung wird in Abbildung 2 das Diagramm einer Eichlösung wiedergegeben, bei der von jeder AS annähernd $1 \mu\text{Mol}$ aufgetragen wurde mit Ausnahme von Harnstoff (etwa $9 \mu\text{Mol}$), Hydroxyprolin ($2 \mu\text{Mol}$), allo-Isoleucin (etwa $0,3 \mu\text{Mol}$), Oxylysin (etwa $0,5 \mu\text{Mol}$), Kreatinin ($5 \mu\text{Mol}$) und Tryptophan ($2 \mu\text{Mol}$). Ferner wurde die Lage folgender Substanzen festgestellt: Methioninsulfon, zwischen Asparaginsäure und Serin gelegen; α -Aminobuttersäure und α -Amino-iso-buttersäure, gemeinsamer Peak mit Cystin; Cystathionin, gemeinsamer Peak mit Valin; Glucosamin, von allo-Isoleucin nicht getrennt; Dopa, gemeinsamer Peak mit Norleucin; α -Amino-Adipinsäure, gemeinsamer Peak mit Alanin; Äthanolamin, knapp vor dem γ -Aminobuttersäure-Peak gelegen, bei größerer Menge im Auftragsgut

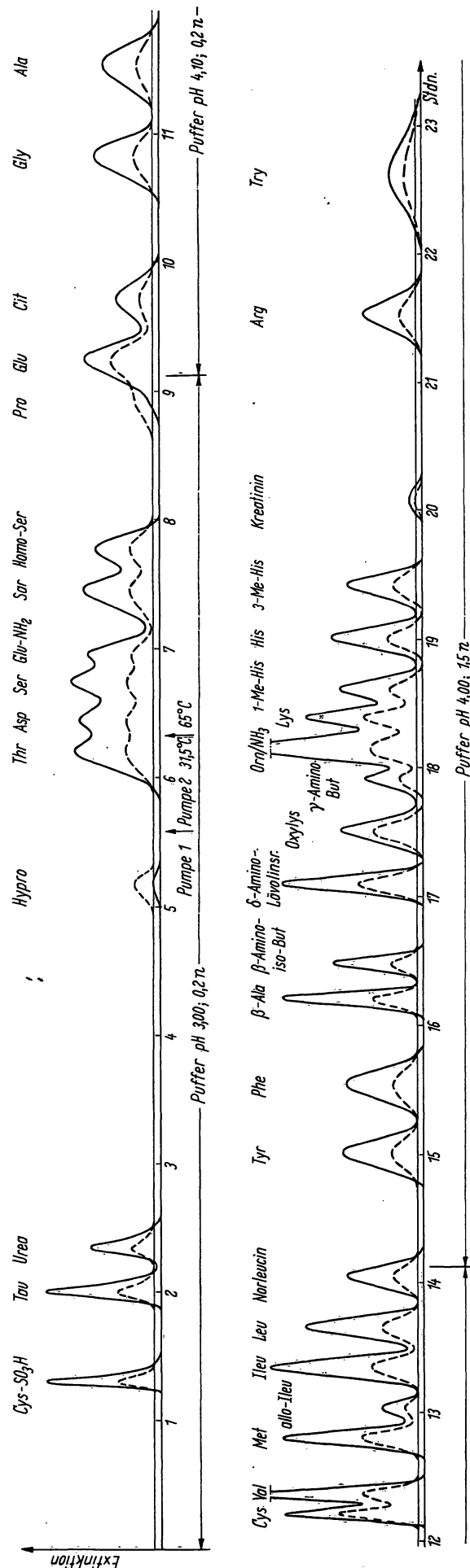


Abb. 2

keine ausreichende Trennung; Ornithin, gemeinsamer Peak mit Ammoniak; Anserin, zwischen 1-Methylhistidin und Histidin gelegen; Carnosin, gemeinsamer Peak mit 3-Methylhistidin.

Soll die Trennung an dem alten Harz *Amberlite CG 120 III/AS* vorgenommen werden, so muß in Abweichung von dem oben beschriebenen Trennprogramm die Anfangstemperatur auf 29,5° und der Puffer 3 auf pH = 3,90 eingestellt werden.

Diskussion

Gegenüber den gut ausgearbeiteten Verfahren zur Analyse von Proteinhydrolysaten zielte diese Arbeit darauf ab, an einem vorhandenen und in Deutschland verbreiteten Gerät die Analyse von biologischen Flüssigkeiten mit ihrer Vielzahl Ninhydrin-positiver Verbindungen zu verbessern. In diesen Substraten ist neben den Trennungen Glutamin/Serin und Glutaminsäure/Citrullin vor allem eine weitgehende Auflösung der basischen AS wichtig. Durch den beschriebenen Analysengang werden erstmals auch mit der HANNIG'schen Aminosäureapparatur diese Forderungen erfüllt. Die Benutzung nur *einer* Säule senkt den Substanzbedarf gegenüber dem klassischen 2-Säulenverfahren von MOORE und STEIN auf die Hälfte.

Zur Ermittlung einer günstigen Verteilung der Gruppe Asparaginsäure — Threonin — Serin — Glutamin wurde der Einfluß von pH-Wert und Temperatur auf ihre Elutionsdauer bestimmt. Im untersuchten pH-Bereich (3,20—2,95; $[Na^+] = 0,2 \text{ } n$; Temperatur konstant = 30°) verlängern niedrige pH-Werte die Elutionszeiten; die Wirkung ist bei Asparaginsäure am größten und nimmt in der Reihenfolge Glutamin, Serin, Threonin

ab. Dieses führt zu einer Umkehrung der Reihenfolge, die unterhalb pH = 3,05 Threonin, Asparaginsäure, Serin, Glutamin ist. Niedrige Temperaturen (35°—25°; $[Na^+] = 0,2 \text{ } n$; pH konstant = 3,00) bedingen identische Veränderungen der Elutionszeiten; der Platzwechsel von Asparaginsäure und Threonin erfolgt zwischen 30° und 35°. — Eine Umkehrung der Reihenfolge tritt auch bei der Gruppe Prolin — Glutaminsäure — Citrullin ein. Eine kritische Stelle ist die Trennung Cystin/Valin; man kann sie am besten durch eine kleine Verschiebung des Umschaltzeitpunktes vom Puffer pH = 3,00 auf pH = 4,10 beeinflussen. Eine ausführliche Untersuchung über den Einfluß von pH, Temperatur und Na^+ -Konzentration auf die Trennung der basischen AS ist bei HAMILTON (5) zu finden.

Im Bereich der basischen AS ist stets eine Anhebung der Nulllinie zu beobachten, die auch von anderen Autoren beschrieben worden ist (3, 10). Als wesentliche Ursache ist der Durchbruch von NH_4^+ anzunehmen, das auch bei sorgfältigstem Arbeiten spurenweise in den Elutionspuffern enthalten ist. — Ein kleiner scheinbarer Peak findet sich an der Stelle von Cystin, wo der Einfluß des Puffers pH = 3,00 in den des Puffers pH = 4,10 übergeht. Seine Fläche ist durch Blindversuch zu ermitteln und als Korrektur in Abzug zu bringen. — Aus technischen Gründen ist hier ein diskontinuierlicher, linearer Verlauf von Puffern verwendet worden. Gegenüber der häufig empfohlenen Gradientenelution entsteht aber kein Nachteil; daß die Peaks am Ende des Einflusses jedes Puffers ein wenig breiter werden, beeinträchtigt die Auswertung nicht nennenswert.

Literatur

1. SPACKMAN, D. H., W. M. STEIN und ST. MOORE, *Analytic. Chem.* 30, 1190 (1958). — 2. HANNIG, K., *Clin. chim. acta* (Amsterdam) 4, 51 (1959). — 3. PIEZ, K. A. und L. MORRIS, *Analyt. Biochem.* (New York) 1, 187 (1960). — 4. JUTISZ, M. und P. DE LA LLOSA, *Bull. Soc. chim. France Mém.*, 2913 (1963). — 5. HAMILTON, P. B., *Analytic. Chem.* 35, 2055 (1963). — 6. KIRSTEN, E. und

R. KIRSTEN, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 7, 76 (1962). — 7. OEPEN, H. und I. OEPEN, *Klin. Wschr.* 41, 921 (1963). — 8. SPACKMAN, D. H., *Federat. Proc.* 22, 244 (1963). — 9. THOMSON, A. R. und B. J. MILLS, *Nature* (London) 203, 483 (1964). — 10. HAMILTON, P. B., *Ann. New York Acad. Sci.* 102, 55 (1962).

Dr. med. Peter Jürgens

Allgem. Krankenhaus S. Georg, Chem.-Physiol. Institut
2 Hamburg I, Lohmühlenstr. 5

KURZMITTEILUNGEN

Dünnschicht-Chromatographie in der Klinik

2. Mitteilung: R_F -Werte weiterer Aminosäuren und verwandter Substanzen

Von J. DITTMANN

Aus der Universitäts-Kinderklinik Homburg, Saar (Direktor: Prof. J. B. Mayer)

(Der Schriftleitung zugegangen am 6. Oktober 1964)

Zweidimensionale Trennung von Aminosäuren an dünnen Cellulose-Schichten ist durch Entwickeln mit n-Propanol-Wasser (7 + 3; v/v; zweimalige Entwicklung) und Isopropanol-Wasser (8 + 2; v/v; einmalige Entwicklung) möglich (1). Die in der 1. Mitteilung an-

gegebenen R_F -Werte waren durch Chromatographie eines Gemischs der 15 erwähnten Substanzen ermittelt worden. Hier soll das Verhalten weiterer Aminosäuren in dem beschriebenen System der Dünnschicht-Chromatographie beschrieben werden.